

研究紹介

遺伝子比較解析による珪藻類 特異的な SET ドメインタンパク質 ファミリーの同定

根本 理子
(農芸化学コース)

A comparative gene analysis reveals a diatom-specific SET domain protein family

Michiko Nemoto
(Course of Agrochemical Bioscience)

The silica cell walls of diatoms, which exhibit species-specific micro- and nano- patterned structures are promising candidates for applications in nanotechnology. Previous studies revealed a number of silica cell wall-associated proteins involved in silica formation. However, molecular biological analyses toward understanding of diatom cell wall formation have been mostly limited to model diatom species and general silica formation process in diatoms is still incompletely understood. In this study, to gain a comprehensive insight into diatom silica biomineralization, transcriptome data of three diatom species, *Nitzschia palea*, *Achnanthes kuwaitensis* and *Pseudoleyanella lunata*, were newly developed. The reads obtained from RNA sequencing were assembled into 31,946, 60,767 and 38,314 unique transcripts for *N. palea*, *A. kuwaitensis* and *P. lunata*, respectively. In order to identify the diatom-specific genes, three transcriptome data sets developed in this study and the protein-coding gene sets of five genome-sequenced diatoms were compared. The proteins shared only by eight diatom species that are predicted to possess an endoplasmic reticulum (ER)-targeting signal peptide were selected for further analyses. These include proteins showing homology to silicanin-1, a recently reported diatom-specific protein involved in silica formation, as well as a number of SET domain proteins. The SET domain proteins might be novel diatom-specific family of methyltransferases that may regulate the function of silica formation related proteins or long chain polyamines. The genes encoding the diatom-specific SET domain proteins identified in this study, which were shown to respond to silicon were suggested to be implicated in silica biomineralization.

Key Words : Biomineralization, Diatom, Silica, Protein

緒 言

珪藻は光合成を行い増殖する微細藻類の一種であり、細胞外にシリカ (SiO₂) から成る被殻を形成する (Fig. 1)。珪藻が形成する被殻は、現在の微細加工技術では合成困難な微細構造を持ち、フォトニック結晶特性や優れた多孔質性を示す機能性材料としても注目されている。珪藻の被殻形成機構を明らかにできれば、ナノテクノロジー分野への応用が可能な新しいセラミックス材料を開発できる可能性がある。

これまで、珪藻の被殻形成機構解明に向けて、被殻に含まれる生体分子の分離が行われてきた。その結果、被殻中には珪藻特異的な長鎖ポリアミン (LCPAs) や多糖、タンパク質が含まれることが明らかにされている¹⁾⁻³⁾。羽状目珪藻 *Cylindrotheca fusiformis* の被殻から分離同定された silaffin ペプチドは、リン酸化、メチル化などの翻訳後修飾を受けており、ケイ酸溶液中でシリカ形成を促進することが報告された⁴⁾。その後、初めてゲノムが解読され、モデル珪藻として広く用いられている中心目珪藻 *Thalassiosira pseudonana* の被殻から、複数の被殻局在タンパク質が分離同定され、その機能が調べられている⁵⁾⁻⁹⁾。また、羽状目珪藻の *Fistulifera solaris* から機能は不明だが、被殻に局在するタンパク質 G7408 が報告されている¹⁰⁾。これらの被殻局在タンパク質は全て、互いに配列相同性を示さない種特異的タンパク質であることが示されている。

近年、珪藻間で保存された初めての被殻局在タンパク質として、被殻形成の場であるシリカ沈着小胞に局在する silicanin-1 タンパク質が同定された¹¹⁾。silicanin-1 ノックアウト株において、シリカ形成量が減少したことから、シリカ形成において重要な役割を担っていることが示唆されている¹²⁾。一方で、ノックアウト株においても被殻形成は完全に阻害されず、このことは珪藻間で保存された被殻形成必須因子が他にも存在することを示唆している。

近年、*T. pseudonana* に加え、*Phaeodactylum tricorutum*, *F. solaris*, *T. oceanica* および *Fragilariopsis cylindrus* の

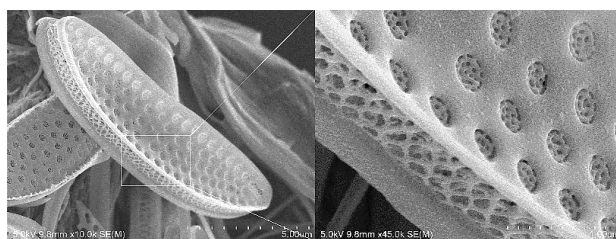


Fig. 1 Scanning electron microscopy (SEM) image of *Pseudoleyanella lunata* cell walls.

Received December 9, 2020

ゲノム解読が報告された¹³⁾⁻¹⁷⁾. 本研究では、珪藻間で普遍的に保存された被殻形成関連タンパク質の同定を目的とし、新たに *Nitzschia palea*, *Achnanthes kuwaitensis*, *Pseudodelanella lunata* のトランスクリプトームデータを取得し、5種の珪藻のゲノムデータとともに網羅的な遺伝子の比較解析を行った。

材料と方法

珪藻株および培養条件

N. palea (NIES-487) および *A. kuwaitensis* (NIES-1349) は国立環境研究所の微生物系統保存施設より入手した。*P. lunata* は福井県立大学の中村憲章氏より提供を受けた。*N. palea* は CSI 培地を用いて、*A. kuwaitensis* および *P. lunata* は f/2 培地を用いて、20°C、15 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光照射条件下で培養を行った。

RNA 抽出および RNA シーケンス解析

藻体のトータル RNA の抽出は、acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (AGPC) 法に基づく TRI Reagent (Molecular Research Center) を用いて行った。対数増殖期の藻体を 9,000 g、10 分、4°C で遠心回収した後、ただちに液体窒素で凍結した。その後、藻体と同重量のジルコニアビーズと TRI Reagent 1 mL を添加し、ビーズビーターで細胞を破碎した (3,200 rpm, 30 秒)。その後の操作はキット添付のプロトコールに従った。抽出した RNA をさらに RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。上記方法で得られたトータル RNA を Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) により定量した。TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kits (Illumina) を用いて次世代シーケンサ解析のためのライブラリを作製後、次世代シーケンサ Illumina HiSeq 2500 を用いて RNA シーケンス解析を行った。

バイオインフォマティクス解析

バイオインフォマティクス解析は国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータを利用して行った。RNA シーケンス解析から得られたリード配列に対し、アダプター配列および低クオリティ配列をトリミングした。トリミング後のリード配列をアセンブルすることでコンティグ配列を取得した。3種の珪藻、*N. palea* および *A. kuwaitensis*, *P. lunata* について得られたコンティグ配列をトランスクリプトームデータとして、遺伝子比較解析に利用した。また、*T. pseudonana* および *P. tricornutum*, *F. solaris*, *T. oceanica*, *F. cylindrus* のゲノムから予測された遺伝子配列を NCBI の GenBank データベースより取得し、比較解析に利用した。まずローカル BLAST を用いて、珪藻遺伝子間の相同性解析を行った。上記解析の結果、全ての珪藻に保存されていた遺伝子を Query として、NCBI の NR データベースから珪藻由来の配列を除いたものに対してさらに BLAST 解析を行った。その結果、他の生物の遺伝子に相同性を示さなかった遺伝子を珪藻

特異的遺伝子として同定した。BLAST の結果から、ヒットがあった遺伝子およびヒットがなかった遺伝子を抜き出すプログラムは、共同研究者の小布施紘准教授に作製していただいたものを使用した。全ての BLAST 解析において、E-value は $1\text{e-}4$ を用いた。上記解析により同定された珪藻特異的遺伝子に対して、さらに ER シグナルペプチドコードするものをスクリーニングした。上記によりスクリーニングされた遺伝子がコードするタンパク質についてドメイン検索、天然変性領域の予測、アミノ酸組成解析を行った。

遺伝子発現解析

同定したタンパク質の遺伝子発現解析には *N. palea* を用いた。*N. palea* の細胞を対数増殖期まで培養した後、Si を添加しない培地 (-Si 培地) で洗浄し、再度 -Si 培地に懸濁し 24 時間培養を行った。その後、ケイ素を終濃度 352 μM になるように添加し、ケイ素添加前、添加後 5 分、5 時間、11 時間、14 時間、17 時間および 20 時間に培養液を回収し、培養液中のケイ素濃度および細胞数を測定した。また、同培養液の細胞から、前述した方法を用いて RNA を抽出した。ケイ素濃度測定にはモリブデンブルー法を用いた¹⁸⁾。抽出した RNA から LunaScript RT SuperMix Kit (New England Biolabs) を用いて cDNA を合成し、Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies) および Luna Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs) を用いて qRT-PCR 解析を行った。各時間における目的遺伝子の発現量を TATA box 結合タンパク質遺伝子 (Np272) の発現量で正規化することで相対比較した。

結 果

RNA シーケンス解析によるトランスクリプトームデータの取得

RNA シーケンス解析から得られたリード配列をトリミング後、*de novo* アセンブルにより、*N. palea*, *A. kuwaitensis*, *P. lunata* について、それぞれ 31,946 個、60,767 個および 38,314 個のユニークなコンティグ配列を取得した。それぞれについて、19,714 個 (62%)、34,888 個 (57%)、27,098 個 (70%) のコンティグ配列は少なくとも 10 個以上の高品質リードによってカバーされていた。

珪藻特異的遺伝子の同定

珪藻のみに保存された珪藻特異的遺伝子の中に珪藻のシリカ被殻形成を制御するコア遺伝子が存在すると考え、珪藻特異的遺伝子の探索を行った。*N. palea*, *A. kuwaitensis* および *P. lunata* のトランスクリプトームデータと *F. cylindrus*, *T. oceanica*, *T. pseudonana*, *F. solaris* および *P. tricornutum* のゲノムデータを用いて、BLAST を用いた相同性解析を行った。その結果、6,841 個から 15,654 個の遺伝子が 8 種の珪藻間で保存されていた (Fig. 2 A)。そのうち、590 個から 1,830 個の遺伝子は

珪藻以外の生物の遺伝子に相同性を示さない、珪藻特異的遺伝子であった。これまでに報告されている被殻局在タンパク質は全てN末端にERシグナルペプチドを持つため、上記珪藻特異的遺伝子の中から、さらにN末端にERシグナルペプチドをコードするものを探索した。トランスクリプトームデータ中には5'末端側が欠失しているものが含まれるため、ERシグナルペプチドの探索以降は *F. cylindrus* のゲノムからスクリーニングされた845個の珪藻特異的遺伝子を用いた。探索の結果、845個のうち、73個の遺伝子がERシグナルペプチドをコードしていた。73個の遺伝子を query として、既知の被殻形成関連タンパク質に対してBLAST解析を行ったところ、12個が silicanin-1 に相同性を示した (Fig. 2B)。同定された silicanin-1 ホモログは、silicanin-1 の特徴であるC末端側の膜貫通ドメインおよびNQ-richドメインを有していた¹¹⁾。残りの61個についてさらに、SMARTを用いたタンパク質ドメイン検索を行ったところ、7個がSETドメインを有していた (Fig. 2B)。また、そのうち5個は互いに相同性を示した。SETドメインタンパク質はリジン残基のメチル化活性を持つことが報告されている¹⁹⁾。SETドメインタンパク質のうちヒストンメチルトランスフェラーゼ (HMTs) とルビスコ大サブユニットメチルトランスフェラーゼ (LSMTs) は最もよく研究されているが、他の多くのSETドメインタンパク質の基質は不明である²⁰⁾。珪藻特異的SETドメインタンパク質は1個から4個のSETドメインを有していた (Fig. 3A)。

この珪藻 (Bacillariophyceae) 特異的SETドメインタンパク質ファミリーを BacSET タンパク質と命名し、さらに解析を行った。BacSET1 はSETドメインの他に、脱炭酸化S-アデノシルメチオニンからアミンへアミノプロピル基を転移するスベルミン/スベルミジン合成ドメインを有していた²¹⁾。BacSET タンパク質のSETドメインとシロイヌナズナのLSMT (AtLSMT) および酵母のHMT (ScHMT) をアライメントした結果、推定の活性中心残基であるチロシンおよび、メチル基供与体であるS-アデノシルメチオニンの結合に関わる残基は保存されていたが、基質結合に関わる残基は保存されていなかった (Fig. 3B)。珪藻のゲノム、トランスクリプトームデータに対して AtLSMT および ScHMT をクエリーとして相同性検索を行ったところ、高い相同性を示すタンパク質が同定されたため、BacSET タンパク質はLSMT および HMT とは別の機能を有するタンパク質ファミリーであることが示唆された。珪藻特異的タンパク質のドメイン検索の結果、SETドメインの他にタンパク質結合ドメインであるPDZ および WW ドメインを持つタンパク質が同定された。これまでに報告されているシリカ被殻局在タンパク質には、天然変性領域を持つものが報告されている^{3), 5), 6)}。73個の珪藻特異的タンパク質のうち、6個は30アミノ酸以上から成る推定の天然変性領域を有していた。その他に、アラニンおよびリシン、酸性アミノ酸、セリンおよびグリシンを高含有するタンパク質が存在していた。

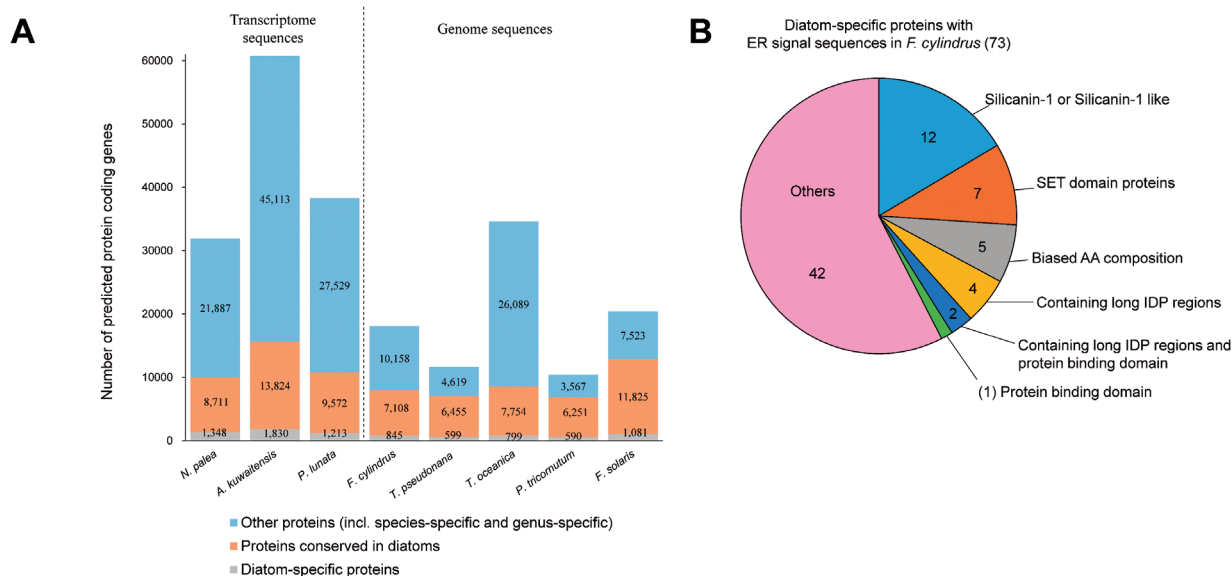


Fig. 2 Comparison of transcriptomes and genomes of diatoms. (A) Categorization of the predicted protein-coding genes in transcriptome and genome sequences of diatoms. (B) Features of diatom-specific proteins with ER signal sequences in *F. cylindrus*, including 12 proteins showing homologies with silicanin-1, 7 proteins with SET domains, 5 proteins with biased amino acid (AA) compositions, 4 proteins containing predicted long IDP regions, 2 proteins containing predicted long IDP regions and protein binding domains (PDZ domain and WW domain), and 1 protein with a protein binding domain (PDZ domain). Reprinted with permission from Nemoto, et al., Mar. Biotechnol., 22(4) : 551–563, 2020. Copyright 2020 Springer Nature.

遺伝子発現解析

遺伝子比較解析により見いだされた珪藻特異的 SET ドメインタンパク質ファミリーの被殻形成への関与を明らかにするため、*N. palea* を用いて被殻形成時の遺伝子発現パターンを解析した。既報²²⁾を参考に、Si を添加しない培地 (-Si 培地) で培養を行い同調した細胞に対し、ケイ素を添加し、一定時間毎に細胞数および培地中のケイ素濃度を測定した。ケイ素を添加後、20 時間後には培地中のケイ素濃度は 352 μM から 0.2 μM まで減少した。また、14 時間後から細胞増殖が確認された。このときの

遺伝子発現パターンを Fig. 4 に示す。遺伝子発現パターンは大きく 3 つに分けられることがわかった。silicanin-1 (Np16494), NpBacSET6 (Np5036) および NpBacSET7 (Np13862) の発現はケイ素添加 5 時間後に大きく誘導されていた (Fig. 4)。NpBacSET5 (Np8261) および NpBacSET1 (Np20729) の発現量は、細胞増殖とともに増加し、細胞増殖停止後は発現量減少が確認された。一方、NpBacSET3 (Np8008), NpBacSET4 (Np11017) および NpBacSET2 (Np10391) の発現パターンには培地中のケイ素濃度変化や細胞増殖との関連は見られなかった。

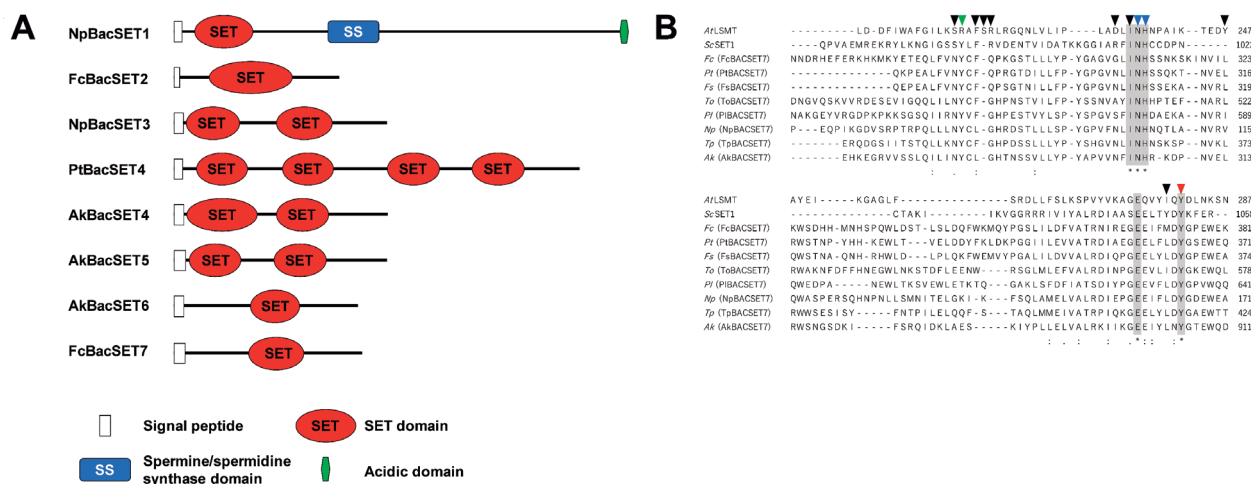


Fig. 3 Analysis of Bacillariophyceae-specific SET domain (BacSET) proteins. (A) schematic of SET domain protein structures in diatoms; (B) representative amino acid sequence alignment of predicted SET domains in diatoms with large subunit methyltransferases (LSMT) and histone methyltransferases (HMT); putative catalytic Tyr residues are indicated by red arrow heads. Blue and black arrow heads indicate residues reported to be involved in AdoMet and substrate lysine binding respectively. A green arrow head indicates residues implicated in both (Trievel et al. 2002). Species abbreviations: At, *Arabidopsis thaliana*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Fc, *Fragilariopsis cylindrus*; Pt, *Phaeodactylum tricornutum*; Fs, *Fistulifera solaris*; To, *Thalassiosira oceanica*; Pl, *Pseudodelanella lunata*; Np, *Nitzschia palea*; Tp, *Thalassiosira pseudonana*; Ak, *Achnanthes kuwaitensis*. Reprinted with permission from Nemoto, et al., Mar. Biotechnol., 22(4): 551–563, 2020. Copyright 2020 Springer Nature.

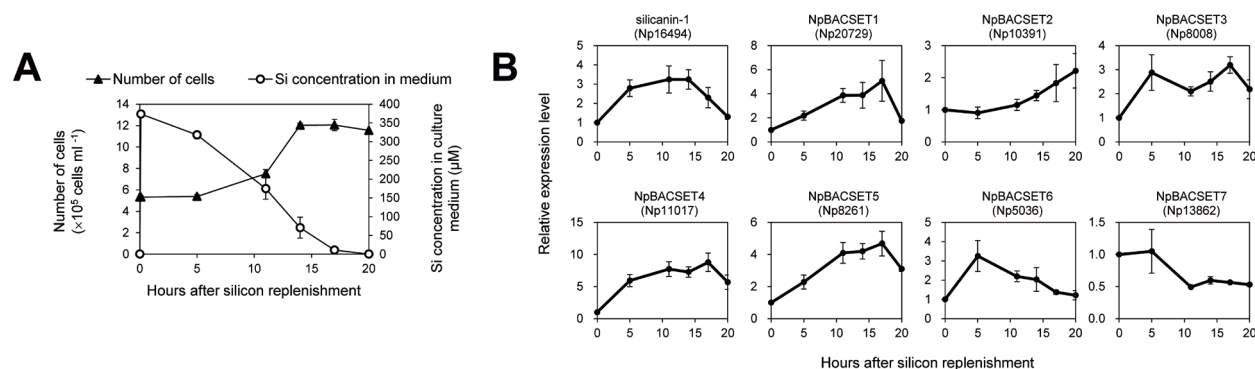


Fig. 4 Expression analysis of unigenes during cell wall formation in *N. palea*. (A) time-course of cell density and Si uptake after replenishment of silicate in Si-starved cultures; expression profiles of unigenes of the silicanin-1 and the SET domain proteins (B) during silicon uptake and cell growth. Data are presented as means \pm standard errors of the mean. Reprinted with permission from Nemoto, et al., Mar. Biotechnol., 22(4): 551–563, 2020. Copyright 2020 Springer Nature.

考 察

本研究では、珪藻のシリカ被殻形成関連遺伝子に着目した、初めての大規模な珪藻間遺伝子比較解析を行った。RNA シーケンス解析の結果得られた、トランスクリプトーム配列の数は、珪藻のゲノムから予測される ORF の数よりも多かった。これは *de novo* アセンブルの結果、連結しなかった短い配列が含まれているためと考えられた。

8 種の珪藻のゲノム、トランスクリプトームデータを比較した結果、590 個から 1,830 個の遺伝子が珪藻特異的遺伝子として同定された。F. cylindrus の珪藻特異的遺伝子を用いてさらに解析を行ったところ、そのうち 73 個が N 末端に ER シグナルペプチドをコードしていた。73 個のタンパク質の中には、珪藻特異的遺伝子として既に報告されている silicanin-1 および silicanin-1 様タンパク質が含まれており、このことは本研究で用いた方法により被殻形成に関わる珪藻特異的遺伝子の絞り込みが行えていることを示している。73 個の珪藻特異的遺伝子の中には 7 個の BacSET タンパク質が含まれていた (Fig. 2 B)。SET ドメインタンパク質は、基質タンパク質のリジン残基をモノ、ジおよびトリメチル化することが報告されている²³⁾。C. fusiformis の被殻から分離され、シリカ形成活性を持つことが示されている silaffin ペプチドはジメチル化およびトリメチル化されたリジン残基を持つことが報告されている^{3), 4)}。また、他の珪藻から分離されたタンパク質や LCPAs もメチル化されていることが示されている^{5), 24), 25)}。合成ポリアミンやシラフィンペプチドを用いた研究から、メチル化の有無が形成されるシリカの形状に影響することが報告されている^{26), 27)}。さらに、リジンのメチル化により生じる第四級アンモニウム基はシリカの重合に影響するオリゴケイ酸陰イオンの形成を促進することが示されている²⁸⁾。本研究で同定された BacSET タンパク質を既知のメチルトランスフェラーゼである HMT および LSMT とアライメントした結果、触媒活性およびメチル基供与体である S-アデノシルメチオニンの結合に関わる残基は保存されていたが、基質結合に関わる残基は保存されていなかったことから、BacSET タンパク質は被殻形成関連タンパク質や LCPAs を基質とするこれまでに報告のない新規のメチルトランスフェラーゼファミリーであることが示唆された。同定した BacSET タンパク質ファミリーのうち、6 個 (BacSET2 から BacSET7) は本研究により初めて同定されたタンパク質であったが、BacSET1 は珪藻のゲノム中から既に同定・報告されたタンパク質と同一のものであった²⁹⁾。遺伝子発現解析の結果、NpBacSET1, NpBacSET5, NpBacSET6, NpBacSET7 は被殻形成前期および後期にその発現量が誘導されており被殻形成への関与が示唆された。今後、本研究により新たに見いだされた珪藻特異的 SET ドメインタンパク質ファミリーの基質の特定や細胞内局在解

析により、これらのタンパク質の被殻形成における役割が明らかになることが期待される。

謝 辞

岡山大学大学院環境生命科学研究科大学院生の岩城沙弥子氏、同所属の小布施祈織准教授には、実験の実施や解析プログラム作成において多大なご助力をいただきました。また、同所属の守屋央朗准教授、門田有希准教授、田村 隆教授、稲垣賢二教授および東京学芸大学教育学部の真山茂樹教授に多くのご助言をいただきました。この場をお借りして心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Sumper, M. and Lehmann, G.: Silica pattern formation in diatoms: Species-specific polyamine biosynthesis. *Chembiochem* **7**, 1419–1427 (2006).
- 2) Brunner, E. *et al.*: Chitin-Based Organic Networks: An Integral Part of Cell Wall Biosilica in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Angewandte Chemie-International Edition* **48**, 9724–9727 (2009).
- 3) Kroger, N., Deutzmann, R. and Sumper, M.: Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science* **286**, 1129–1132 (1999).
- 4) Kroger, N., Lorenz, S., Brunner, E. and Sumper, M.: Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. *Science* **298**, 584–586 (2002).
- 5) Poulsen, N. and Kroger, N.: Silica morphogenesis by alternative processing of silaffins in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 42993–42999 (2004).
- 6) Scheffel, A., Poulsen, N., Shian, S. and Kroger, N.: Nanopatterned protein microrings from a diatom that direct silica morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 3175–3180 (2011).
- 7) Wenzl, S., Hett, R., Richthammer, P. and Sumper, M.: Silacidins: Highly acidic phosphopeptides from diatom shells assist in silica precipitation in vitro. *Angewandte Chemie-International Edition* **47**, 1729–1732 (2008).
- 8) Davis, A. K., Hildebrand, M. and Palenik, B.: A stress-induced protein associated with the girdle band region of the diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology* **41**, 577–589 (2005).
- 9) Tesson, B., Lerch, S. J. L. and Hildebrand, M.: Characterization of a New Protein Family Associated With the Silica Deposition Vesicle Membrane Enables Genetic Manipulation of Diatom Silica. *Scientific Reports* **7**, (2017).
- 10) Nemoto, M. *et al.*: Identification of a frustule-associated protein of the marine pennate diatom *Fistulifera* sp strain JPCC DA0580. *Marine Genomics* **16**, 39–44 (2014).
- 11) Kotzsch, A. *et al.*: Silicanin-1 is a conserved diatom membrane protein involved in silica biomineralization. *Bmc Biology* **15**, (2017).
- 12) Gorlich, S., Pawolski, D., Zlotnikov, I. and Kroger, N.: Control of biosilica morphology and mechanical performance by the conserved diatom gene Silicanin-1. *Communications Biology* **2**, (2019).
- 13) Armbrust, E. V. *et al.*: The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science* **306**, 79–86 (2004).

- 14) Bowler, C. *et al.* : The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **456**, 239—244 (2008).
- 15) Tanaka, T. *et al.* : Oil Accumulation by the Oleaginous Diatom *Fistulifera solaris* as Revealed by the Genome and Transcriptome. *Plant Cell* **27**, 162—176 (2015).
- 16) Lommer, M. *et al.* : Genome and low-iron response of an oceanic diatom adapted to chronic iron limitation. *Genome Biology* **13**, 20 (2012).
- 17) Mock, T. *et al.* : Evolutionary genomics of the cold-adapted diatom *Fragilariopsis cylindrus*. *Nature* **541**, 536—540 (2017).
- 18) Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R. : A Practical Handbook of Seawater Analysis. Vol. 167 (Fisheries Research Board of Canada, 1968).
- 19) Herz, H. M., Garruss, A. and Shilatfard, A. : SET for life biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **38**, 621—639 (2013).
- 20) Trievel, R. C., Beach, B. M., Dirk, L. M. A., Houtz, R. L. and Hurley, J. H. : Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase. *Cell* **111**, 91—103 (2002).
- 21) Wu, H. *et al.* : Structure and mechanism of spermidine synthases. *Biochemistry* **46**, 8331—8339 (2007).
- 22) Hildebrand, M., Frigeri, L. G. and Davis, A. K. : Synchronized growth of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) provides novel insights into cell-wall synthesis processes in relation to the cell cycle. *Journal of Phycology* **43**, 730—740 (2007).
- 23) Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C. and Cheng, X. D. : The SET-domain protein superfamily : protein lysine methyltransferases. *Genome Biology* **6**, (2005).
- 24) Wenzl, S., Deutzmann, R., Hett, R., Hochmuth, E. and Sumper, M. : Quaternary ammonium groups in silica-associated proteins. *Angewandte Chemie-International Edition* **43**, 5933—5936 (2004).
- 25) Sumper, M. and Brunner, E. : Learning from diatoms : Nature's tools for the production of nanostructured silica. *Advanced Functional Materials* **16**, 17—26 (2006).
- 26) Bernecker, A. *et al.* : Tailored Synthetic Polyamines for Controlled Biomimetic Silica Formation. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 1023—1031 (2010).
- 27) Lechner, C. C. and Becker, C. F. W. : Exploring the effect of native and artificial peptide modifications on silaffin induced silica precipitation. *Chemical Science* **3**, 3500—3504 (2012).
- 28) Hoebbel, D. *et al.* : ON THE CONSTITUTION OF SILICATE ANIONS IN TETRAETHYLAMMONIUM SILICATES AND THEIR AQUEOUS-SOLUTIONS. *Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie* **465**, 15—33 (1980).
- 29) Michael, A. J. : Molecular machines encoded by bacterially-derived multi-domain gene fusions that potentially synthesize, N-methylate and transfer long chain polyamines in diatoms. *Febs Letters* **585**, 2627—2634 (2011).